Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, 2024, p. 147-157

Inhibitory Effect of Endophytic Bacteria with Auxin Production Ability on *Diplodia bulgarica*, the Causative Agent of Apple Canker in East Azerbaijan Province

S. Hagverdi[1], R. Khakvar[2*], M. Arzanlou[2], N. Aliasgharzad[3]

1 and 2- Former M.Sc Student and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: khakvar@tabrizu.ac.ir)
3- Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 18-06-2023 Revised: 12-04-2024 Accepted: 15-04-2024 Available Online: 21-07-2024	**How to cite this article:** Hagverdi, S., Khakvar, R., Arzanlou, M., & Aliasgharzad, N. (2024). Inhibitory effect of endophytic bacteria with auxin production ability on *Diplodia bulgarica*, the causative agent of apple canker in East Azerbaijan province. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, *38*(2), 147-157. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.2024.82876.1148

Introduction

The apple (*Malus domestica* Borkh.), a cornerstone of Iran's agricultural exports, plays an important role in the nation's economy. The cultivation of this fruit, however, is frequently exposed to a multitude of pests and diseases, especially fungi from the Botryosphaeriaceae family emerging as a significant threat. Among these, *Diplodia bulgarica* is a particularly harmful fungus that causes a lot of damage to apple orchards. Traditional management strategies have predominantly relied on chemical fungicides; however, these methods have several problems, including environmental contamination, food safety concerns, and the potential for pathogen resistance. These issues highlight the critical need for alternative solutions. To deal with these problems, experts in plant diseases are looking more at using biological control agents as a viable and environmentally friendly option. Endophytic bacteria, a group of non-pathogenic microorganisms that inhabit plant tissues, are leading this change. By producing essential growth factors, these bacteria not only enhance the metabolic processes of their host plants but also protect them from many diseases and environmental stress. Their mode of action is not limited to direct antagonistic actions like nutrient competition and antibiotic production; they also take in a range of indirect strategies that effectively inhibit plant diseases. Using endophytic bacteria to control plant diseases is a new, exciting and promising direction toward sustainable agriculture. Their dual role as biocontrol agents and promoters of plant health offers a comprehensive strategy for enhancing crop resilience. Ongoing research is revealing how endophytic bacteria could transform the way we protect plants and increase farm yields, marking a new era in the management of apple and other fruit tree diseases.

Materials and Methods

This study aimed to isolate auxin-producing endophytic bacteria from apple trees in the orchards of East Azerbaijan province and assess their capacity to inhibit the pathogenic fungus *Diplodia bulgarica* the major causal agent of apple tree decline in Northwest Iran. To do this, healthy branches from apple trees in East Azerbaijan

https://doi.org/10.22067/jpp.2024.82876.1148

province in northwest Iran were sampled, resulting in 110 isolates of endophytic bacteria being isolated and subsequently analyzed. Employing the dual-culture method, researchers identified the most effective isolate exhibiting the strongest antagonistic effect. Subsequently, fifty isolates out of the initial 110 were chosen for further investigation based on their promising antifungal properties. To statistically analyze the auxin production data, researchers conducted a variance analysis (ANOVA). Finally, Duncan's multiple range test (DMRT) at a 1% significance level was used to compare the mean auxin production values among these selected isolates. Identification was carried out based on polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of the 16S rDNA region, along with biochemical assays including gram staining, catalase, oxidase, arginine hydrolase, and others.

Results and Discussion

The dual-culture assay results led to the selection and preservation of 50 isolates demonstrating varying degrees of antagonistic potential. Of these, 37 isolates (74%) were identified as gram-positive, while the remaining 13 isolates were gram-negative. The inhibition percentage of these isolates ranged from 10% to 79%. Notably, five endophytes exhibited high inhibition rates (74-79%), were also effective in auxin production. The auxin production assay revealed that, on average, bacterial isolates produced 5.5 mg/ml of auxin in the absence of tryptophan and 8.58 mg/ml in its presence. Based on biochemical and molecular identification, all five isolates belonged to the *Bacillus* genus, with more than 99% similarity. These included *Bacillus xiamenensis*, *Bacillus sonorensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus mojavensis*, and *Bacillus subtilis*. *Bacillus mojavensis* demonstrated the highest auxin production, yielding up to tenfold more auxin without tryptophan and fivefold more with tryptophan compared to other isolates. The study also found that adding L-tryptophan to the bacterial growth medium generally increased auxin production. In the qualitative evaluation, a pink color change was observed exclusively in the *B. mojavensis* isolate.

Conclusion

While fungicides are highly effective, their escalating use has led to serious repercussions, including environmental pollution, toxic residues in food, pathogen resistance, and socio-economic issues. The substantial costs and consumer demand for chemical-free produce have spurred researchers to seek viable alternatives to these agents. In this study, five *Bacillus* bacterial isolates were identified from apple trees in Iran's northwestern regions. These isolates not only exhibit strong inhibitory effects against the fungus *Diplodia bulgarica* but also possess the capability to produce significant amounts of the phytohormone auxin (IAA). Consequently, they can be recommended to farmers as both an alternative to fungicides and as biofertilizers. The deployment of these bacteria promises not only the effective and safe mitigation of pathogens but also supports plant growth and development through hormone production.

Keywords: *Bacillus*, Biocontrol, Pphytohormone, Trunk canker

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸ شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۱۵۷-۱۴۷

بررسی اثر بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت با توان تولید اکسین، روی قارچ *Diplodia bulgarica* عامل بیماری شانکر سیب در استان آذربایجان شرقی

سمانه حق‌وردی[۱]- رضا خاک‌ور[۲*]- مهدی ارزنلو[۲]- ناصر علی‌اصغرزاد[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۲۷

چکیده

درخت سیب از عمده‌ترین محصولات باغی و صادراتی ایران و استان آذربایجان‌شرقی می‌باشد. از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول در منطقه، بیماری شانکر ناشی از قارچ *Diplodia bulgarica* می‌باشد. روش‌های مختلفی برای کنترل این بیماری معرفی شده است که در بین آن‌ها استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک، به‌عنوان روشی دوستدار محیط‌زیست و پایدار مورد توجه گیاه‌پزشکان می‌باشد. از عوامل کنترل بیولوژیک نوین که اخیرا بسیار مورد توجه بوده است استفاده از باکتری‌های اندوفیت می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر، جداسازی باکتری‌های اندوفیت تولیدکننده اُکسین، از درختان سیب در باغات اطراف شهرستان تبریز و بررسی توان آن‌ها در کنترل قارچ بیمارگر *Diplodia bulgarica* بود. بدین منظور، نمونه‌برداری از شاخه‌های سالم درختان سیب باغات استان آذربایجان‌شرقی انجام پذیرفت و ۱۱۰ جدایه باکتری اندوفیت جداسازی و مورد بررسی قرارگرفت. انتخاب بهترین جدایه با بیشترین اثر آنتاگونیستی به روش کشت متقابل انجام پذیرفت. پنجاه جدایه باکتریایی از ۱۱۰ جدایه جمع‌آوری شده که اثر بازدارندگی روی قارچ را از خود نشان دادند، از لحاظ تولید اکسین مورد آزمایش قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده انجام و مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ صورت گرفت و شناسایی براساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تعیین توالی ناحیه 16S rDNA و تعدادی آزمون‌های بیوشیمیایی صورت گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که پنج جدایه باکتریایی از مجموع جدایه‌های مورد آزمایش با ۷۹-۷۴٪ بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر، توان تولید مؤثر اکسین را نیز داشتند. براساس داده‌های بیوشیمیایی و توالی‌یابی انجام گرفته در پژوهش حاضر، هر پنج جدایه انتخاب شده متعلق به جنس *Bacillus* می‌باشند. کاربرد چنین باکتری‌هایی علاوه بر کنترل بهینه و بی‌خطر بیمارگر، می‌توانند در رشد و نمو گیاه نیز بعلت تولید هورمون‌های گیاهی مفید واقع شوند.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، بیوکنترل، شانکر تنه، هورمون گیاهی

مقدمه

سیب با نام علمی *Malus domestica* Borkh. در ایران یکی از محصولات مهم کشاورزی و یکی از اصلی‌ترین منابع صادرات غیرنفتی کشور در بخش کشاورزی می‌باشد به‌طوری‌که در حال حاضر کشور ایران مقام هفتم تولید سیب در جهان و در مقام دهم از لحاظ صادرات را در دنیا دارا می‌باشد (Najari, 2020). گونه‌های مختلفی از تیره Botryosphaeriaceae به‌عنوان عوامل مولد پوسیدگی و شانکر شاخه و تنه روی درختان سیب از مناطق مختلف دنیا گزارش شده‌اند که در بین آن‌ها گونه *Diplodia bulgarica* یکی از مخرب‌ترین قارچ‌های بیمارگر سیب در جهان است که باعث شانکر شاخه، تنه و سرانجام زوال درخت می‌شود (Zeynali Eken, 2022 ; *et al*., 2021). برای کنترل این بیماری روش‌های مختلف شیمیایی،

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: khakvar@tabrizu.ac.ir)
۳- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
https://doi.org/10.22067/jpp.2024.82876.1148

فیزیکی و بیولوژیک توصیه شده است که در بین آن‌ها کنترل شیمیایی با استفاده از قارچ‌کش‌ها به‌عنوان مهم‌ترین روش در مدیریت بیماری‌های شانکر ناشی از قارچ‌های خانواده Botryosphaeriaceae در نظر گرفته می‌شود (Hanifeh *et al.*, 2017). با وجود این که کارایی سموم قارچ‌کش زیاد می‌باشد، استفاده روز افزون از سموم شیمیایی تأثیرات منفی شدیدی از جمله آلودگی‌های زیست‌محیطی، وجود باقی‌مانده سموم روی مواد غذایی، ظهور مقاومت در بیمارگر و همچنین بروز مشکلات اجتماعی و اقتصادی را به‌دنبال دارد (Cawoy *et al.*, 2014).

از بین روش‌های نوین و دوستدار محیط‌زیست، استفاده از باکتری‌های اندوفیت بعنوان عامل بیوکنترل به سرعت در حال توسعه می‌باشد (Vasebi *et al.*, 2023; Jacob *et al.*, 2020). باکتری های اندوفیت از میکروارگانیسم‌های غیر بیماری‌زای ساکن بافت گیاهی‌اند که با حفظ بقای خود در گیاه میزبان، نه تنها زیانی به میزبان نمی‌رسانند بلکه با تولید فاکتورهای رشدی باعث افزایش متابولیسم، رشد و مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و تنش‌های محیطی می‌شوند (Luna *et al*., Mantelin & Touraine, 2004 ;2002). باکتری‌های اندوفیت علاوه بر روش‌های مستقیم (رقابت غذایی با بیمارگر، پارازیتیسم و یا تولید آنتی بیوتیک‌ها علیه بیمارگر) بصورت غیر مستقیم نیز باعث کنترل بیمارگرهای مختلف گیاهی می شوند (Moslehi *et al*., 2021). یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌هایی که انواع مختلف باکتری‌های اندوفیت به‌وسیله آن موجب ارتقا رشد و افزایش عملکرد گیاه می‌شوند، تولید گروهی از فیتوهورمون‌های محرک رشد می‌باشد که مهم‌ترین آن‌ها ایندول استیک اسید (IAA) است (Thoa *et al*., 2022). لذا هدف از این پژوهش بررسی فعالیت ضد قارچی باکتری‌های اندوفیت با توان تولید اکسین علیه قارچ *Diplodia bulgarica* عامل شانکر سیب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های باکتریایی و قارچی

به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت درختان سیب، نمونه‌های گیاهی از ساقه‌های یکساله و دوساله ازدرختان سیب بالغ، سالم و بدون هیچ گونه نشانه‌ی بیماری از باغات سیب استان آذربایجان‌شرقی درسال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ طی ماه‌های تیر تا شهریور به صورت تصادفی جمع‌آوری گردید. نمونه‌های بلافاصله پس از جمع‌آوری، به آزمایشگاه باکتری‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز انتقال یافتند و در یخچال با دمای ۴ درجه سیلسیوس نگهداری و حداکثر تا ۴۸ ساعت پس از نمونه‌برداری در محیط آگار غذایی (NA) کشت داده شدند. جدایه قارچی *Diplodia bulgarica* از آزمایشگاه قارچشناسی تحصیلات تکمیلی دانشگاه تبریز، تهیه و در محیط‌کشت سیب زمینی- دکستروز آگار (PDA) تجدید کشت گردید.

به‌منظور جداسازی باکتری‌های اندوفیت، شاخه‌ها با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. پس از خشک شدن روی کاغذ صافی، نمونه‌ها با قیچی باغبانی سترون، به قطعات کوچک‌تر خرد و با غوطه ور نمودن در محلول‌های ضدعفونی (پنج دقیقه الکل ۷۰٪، ده دقیقه هیپوکلریت سدیم ۱٪، سی ثانیه الکل ۹۶٪ سپس سه بار شستشو با آب مقطر سترون) سترون شدند. بافت‌های ضدعفونی‌شده به قطعات ۱ الی ۲ سانتی‌متری تقسیم شدند و در زیر جریان هوای هود لامینار خشک شده و در روی محیط NA قرار گرفتند. پتری‌ها به‌مدت ۱۴ روز در دمای۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری‌شدند (Javadi-Dodoran *et al.*, 2022). برای اثبات اندوفیت بودن جدایه‌های جمع‌آوری شده و حذف باکتری‌های اپی‌فیت احتمالی، از روش غلامی و همکاران (Gholami *et al.*, 2013) استفاده گردید. بدین منظور قطعاتی از بافت‌هایی که به روش بالا ضدعفونی شده بودند در ۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر سترون فرو برده شدند و به‌مدت ۱ دقیقه تکان داده شدند. ۰/۳میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل روی محیط NA مایه‌زنی و در ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت بررسی رشد احتمالی میکروبی نگهداری شد.

بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی

برای انجام این آزمایش و به‌منظور انتخاب جدایه‌های مناسب از روش کشت متقابل استفاده گردید. برای شروع کار در پتری‌های ۹ سانتی‌متری محیط کشت NA+PDA (به نسبت ۱:۱) تهیه شد (Arzanlou *et al.*, 2016). سپس به فاصله یک سانتی‌متری از حاشیه پتری، باکتری‌ها به‌صورت خطی کشت داده شدند. یک قرص ۵ میلی‌متری از کشت تازه جدایه قارچی برش داده شد و در مرکز پتری‌قرار گرفت. پتری شاهد حاوی دیسک جدایه قارچی در مرکز بود. پتری‌ها به‌مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور نگه‌داری شدند. این آزمون در ۴ تکرار انجام شد و درصد بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در مقایسه با شاهد براساس فرمول زیر محاسبه و یادداشت گردید (Gholami *et al.*, 2014). تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده انجام و مقایسه میانگین رشد با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ صورت گرفت.

$$PIRG(\%) = [(R_1 - R_2)/R_1] \times 100$$

PIRG= درصد بازدارندگی رشد شعاعی بیمارگر

R_1 = رشد شعاعی بیمارگر در تیمار شاهد

R_2= رشد شعاعی بیمارگر در تیمار حاوی بیمارگر و آنتاگونیست

اندازه‌گیری توان تولید اُکسین جدایه‌ها

توان تولید اکسین یا ایندول‌استیک‌اسید (IAA) جدایه‌های بدست آمده با استفاده از محیط‌کشت عاری از نیتروژن (N-free media; NF) در ۳ تکرار انجام شد. از کلریدآمونیوم به مقدار یک گرم در لیتر جهت تأمین نیتروژن مورد نیاز باکتری‌ها در این محیط استفاده شد. ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه هر جدایه به ۳۰ میلی‌لیتر محیط حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر ال-تریپتوفان منتقل شد و بعد از ۷۲ ساعت سوسپانسیون باکتری رسوب داده شد (rpm=۵۰۰۰ به‌مدت ده دقیقه) و دو میلی‌لیتر از محلول رویی با چهار میلی‌لیتر از معرف سالکوفسکی (۰،۵ مولار $FeCl_3$ در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده ۳۰۰ میلی‌لیتر اسید سولوفوریک H_2SO_4 یک مولار به آن اضافه می‌گردد) مخلوط شد. این مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس مقدار جذب نوری با استفاده از اسپکتوفوتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار تولید IAA توسط هر جدایه از مقایسه جذب نور در سوسپانسیون آن جدایه با منحنی استاندارد (تهیه شده در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر IAA) محاسبه شد. تولید اکسین توسط جدایه‌ها در دو حالت حضور (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و عدم حضور تریپتوفان مورد بررسی قرار گرفت (Deaker *et al.*, 2011). سنجش کیفی تولید IAA توسط جدایه‌های باسیلوس براساس روش ساریواستاوا و کومار (Sharivastava & Kumar, 2011) با اندکی تغییر انجام شد. در این روش پتری حاوی محیط‌کشت جامد NF دارای ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید آمینهٔ L-تریپتوفان (سترون شده با روش فیلتر) آماده شد. پتری به چهار قسمت مساوی تقسیم و در هر قسمت، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با چگالی نوری (Optical Dencity) یکسان مایه‌زنی شد. پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. واکنش مثبت در تولید اکسین سی دقیقه بعد از اضافه کردن معرف سالکوفسکی به‌صورت ظهور هاله به رنگ صورتی مشخص گردید. در انتهای آزمایش قطر هاله (HD) و قطر پرگنه (CD) اندازه‌گیری و متوسط نسبت قطر هاله به قطر پرگنه CD/HD برای هر جدایه محاسبه و این میزان مبنای درجه‌بندی نیمه‌کمی توان تولید IAA قرار گرفت (Bric *et al.*, 1991). از محلول‌های استاندارد IAA در غلظت‌های متفاوت، برای سهولت تشخیص و شدت رنگ هاله‌ی صورتی استفاده شد.

شناسایی باکتری‌ها

شناسایی باکتری‌های اندوفیت که توان آنتاگونیستی بالا همراه با توان تولید اکسین را از خود نشان دادند با استفاده از تعدادی آزمون بیوشیمیایی شامل آزمون گرم، اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز نشاسته و تجزیه آرژنین (Schaad *et al.*, 2001) و توالی‌یابی نوکلوتیدی ناحیه 16s rDNA انجام گرفت. پس از استخراج DNA باکتریایی به روش (Sambrook, 1990) واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی 8f (5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) و 1492r (5’-GGTTACCTTGTTACGACTT-3’) و در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گردید (Alizadeh *et al.*, 2017).

محصولات PCR در ژل آگاروز ۱٪ به‌مدت ۴۵ دقیقه در اختلاف پتانسیل ۸۰ ولت الکتروفورز گردید. محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت ژن فن‌آوران ارسال گردید. توالی بدست آمده پس از ویرایش با نرم‌افزار BioEdite با فرمت FASTA ذخیره و با توالی های موجود در بانک توالی‌های ژنی (NCBI) و با آزمون مشابهت‌یابی Blastn مقایسه شدند. آنالیز توالی‌ها و رسم درخت فیلوژنی با Bootstrap بر پایه ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از نرم‌افزار مگا نسخه ۱۰ (MEGA X) و به روش اتصال مجاور (Neighbor Joining) انجام گردید.

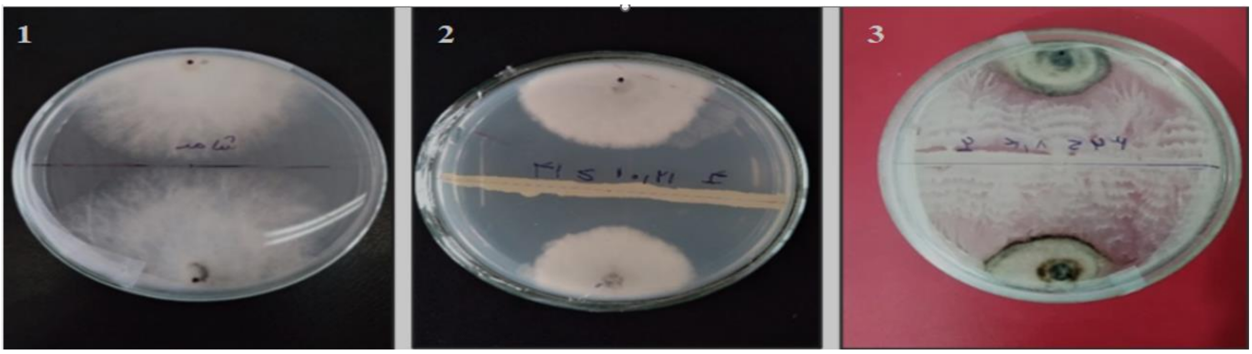
نتایج

در مجموع ۱۱۰ جدایه‌ی باکتری اندوفیت از شاخه‌های درختان سالم سیب باغات استان آذربایجان‌شرقی جداسازی گردید و برای ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ *Diplodia bulgarica* در آزمایشگاه مورد بررسی قرارگرفتند. براساس نتایج آزمون کشت متقابل، در بین جدایه‌های بدست آمده، ۵۰ جدایه که درجاتی از توان آنتاگونیستی از خود نشان دادند انتخاب و نگهداری شدند (شکل ۱). ۳۷ جدایه از این ۵۰ جدایه، گرم مثبت (۷۴٪) و ۱۳ جدایه (۲۶٪) گرم منفی مشخص شدند. درصد بازدارندگی این جدایه‌ها از رشد قارچ بیمارگر بین ۱۰ تا ۷۹٪ تعیین گردید.

ارزیابی کمی و کیفی تولید اکسین

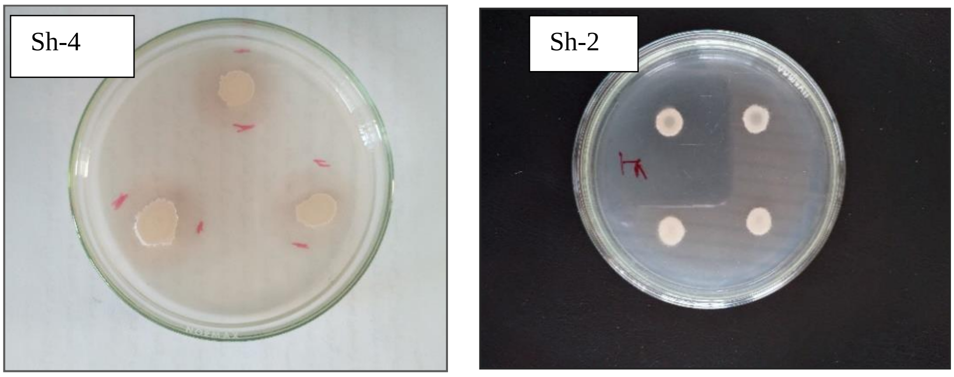
تمام ۵۰ جدایه منتخب با توان آنتاگونیستی، مورد ارزیابی کمی و کیفی تولید اکسین قرار گرفتند. از بین ۵۰ جدایه منتخب، فقط شش جدایه تولید حد قابل توجه اکسین در بازه ۳ تا ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ppm) از خود نشان دادند که نتایج در جدول ۱ آورده شده است. میانگین تولید اکسین توسط جدایه‌های باکتریایی در عدم حضور تریپتوفان ۵،۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در حضور تریپتوفان ۸،۵۸ میلی گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. بیشترین میزان تولید اکسین در هر دو حالت مربوط به جدایه Sh-4 بود. نتایج نشان داد که افزودن ال-تریپتوفان به محیط رشد باکتری‌ها، کم و بیش باعث تولید بیشتر اکسین شده است (جدول ۱). در روش ارزیابی کیفی، تغییر رنگ صورتی در هیچ‌کدام یک از جدایه‌ها بغیر از جدایه Sh-4 مشاهده نگردید (شکل ۲). همچنین برای این جدایه، مقدار تولید اکسین CD/HD=3.2/1.3=1.76 تعیین گردید. از شش جدایه با

توان تولید اکسین به جز یک جدایه (Sh-5) بقیـه تـوان انتاگونیسـتی بالای ۷۰٪ را از خود نشان داده بودند. بنـابراین ایـن پـنج جدایـه بـه روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتنـد (جـدول ۲)(شکل ۳).



شکل ۱- کشت متقابل قارچ *Diplodia bulgarica* با جدایه‌های باکتریایی اندوفیت جداشده از درختان سیب در استان آذربایجان‌شرقی جهت ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی

Figure 1- Dual-culture of *Diplodia bulgarica* with endophytic bacteria isolated from apple trees in East Azerbaijan for antagonistic activity assay



شکل ۲- آزمون کیفی توان تولید اکسین توسط جدایه‌های باکتریایی اندوفیت شاخه درختان سیب باغات استان آذربایجان‌شرقی– تولید مشخص رنگ صورتی در حضور معرف سالکوفسکی در نمونه قوی (Sh-4)(چپ) و تولید اندک رنگ صورتی در حضور معرف سالکوفسکی در نمونه ضعیف (Sh-2) (راست)

Figure 2- Qualitative assessment of auxin (IAA) production capability by endophytic bacterial isolates from apple tree in East Azerbaijan Province for antagonistic activity assay- the distinct production of a pink color in the presence of Salkowski's colorimetric assay (left)(Sh-4) and weaker (right)(Sh-2) samples

جدول ۱- مقایسه میانگین تولید اکسین توسط جدایه‌های باکتریایی اندوفیت در حضور و عدم حضور تریپتوفان

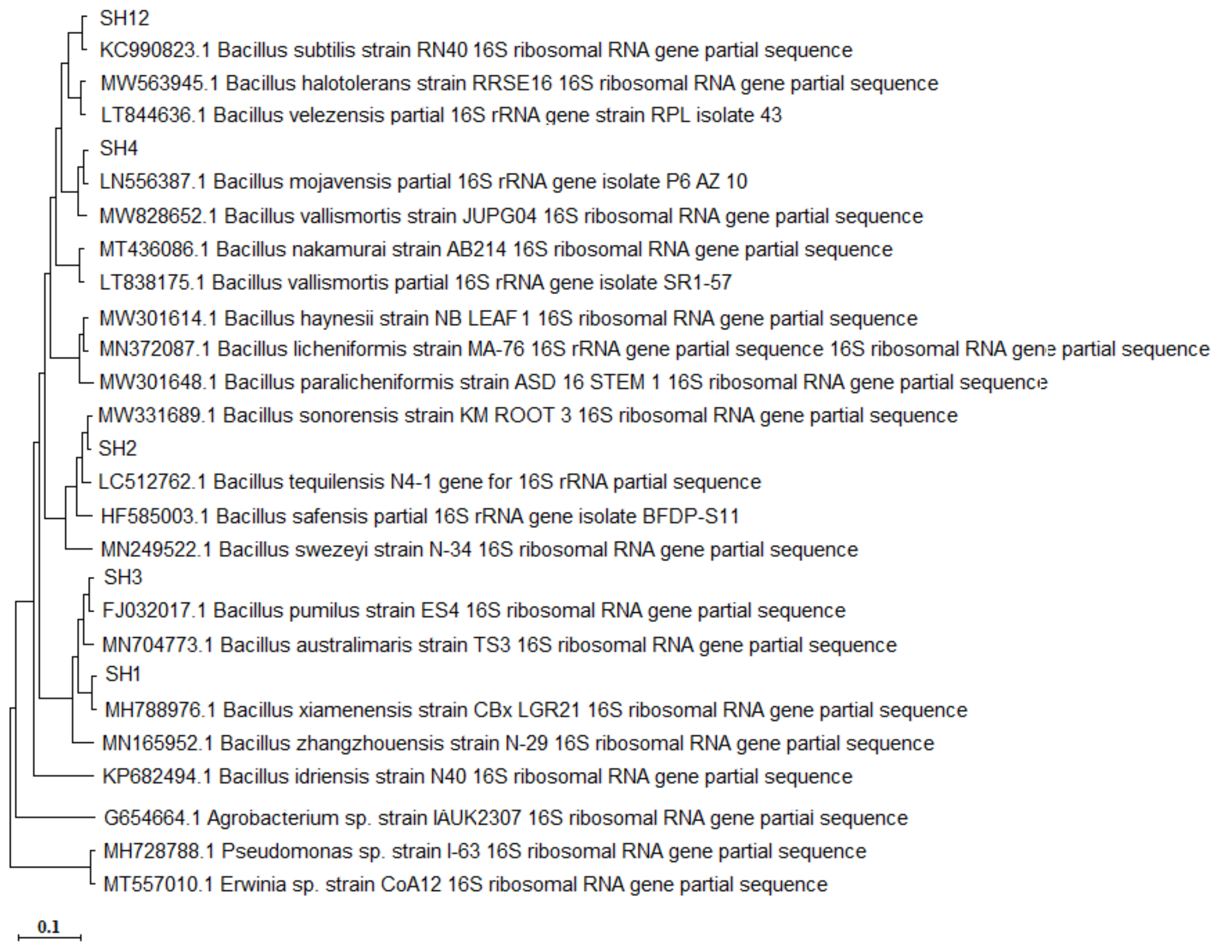
Table 1– Mean comparison of IAA production by endophytic bacteria in presence and absent of Tryptophan

تولید اکسین در حضور تریپتوفان Auxin production in Tryptophan presence (ppm)	تولید اکسین در عدم حضور تریپتوفان Auxin production in Tryptophan absence (ppm)	جدایه باکتری Bacterial Isolate code
8.04^{bc}	3.58^{d}	Sh-1
1.46^{e}	2.15^{e}	Sh-2
7.88^{cd}	5.33^{c}	Sh-3
10.26^{b}	5.49^{c}	Sh-12
15.04^{a}	7.56^{a}	Sh-4
8.79^{bc}	6.85^{bc}	Sh-5
1.66^{e}	0.39^{f}	Control

جدول ۲- درصد بازدارندگی جدایه‌های باسیلوس اندوفیت منتخب در برابر قارچ *Diplodia bulgarica* و نتیجه توالی‌یابی ناحیه 16S rDNA و نیز برخی آزمون‌های بیوشیمیایی

Table 2- The inhibition percentage of selected endophytic *Bacillus* isolates on *Diplodia bulgarica*, and the outcomes of 16S rDNA sequencing alongside with biochemical assays

گونه Species	کد جدایه Code	درصد بازدارندگی Inhibition percentage	تست ارژنین Arginine assay	اکسیداز Oxidase assay	کاتالاز Catalase assay	لهانیدن سیب‌زمینی Potato softening assay	تست گرم Gram staining
Bacillus xiamenensis	Sh-1	79%	−	−	+	−	+
Bacillus sonorensis	Sh-2	74.5%	+	+	−	+	+
Bacillus tequilensis	Sh-3	76%	−	−	−	−	+
Bacillus mojavensis	Sh-4	78%	−	−	−	+	+
Bacillus subtilis	Sh-12	74%	+	+	−	+	+



شکل ۳- تبارنمای رسم شده بر اساس ناحیه 16S rDNA با روش Neighbor Joining و با بوت استرپ برابر با ۱۰۰۰ برای باکتری‌های اندوفیت جدا شده از درختان سیب با توان تولید اکسین، سه جدایه از باکتری‌های گرم منفی شامل (*Agrobacterium, Pseudomonas, Erwinia*) بعنوان گروه خارجی استفاده شده است

Figure 3- Phylogenetic tree drawn for 16srDNA region using Neighbor Joining algorithm with 1000 bootstrap replication for endophytic bacteria with IAA production capability isolated from apple trees; three gram-negative bacteria (*Agrobacterium, Pseudomonas, Erwinia*) were used as out-group

پنج باکتری منتخب مورد شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی قرار گرفتند. هر پنج جدایه منتخب با پرایمرهای عمومی ناحیه 16S rDNA باند تقریبا ۱۵۰۰ نوکلئوتیدی تولید کردند. محصولات PCR پس از توالی‌یابی و رسم درخت فیلوژنتیک همگی جز جنس باسیلوس

شناسایی شدند (جدول ۲)(شکل ۳). آزمون‌های بیوشیمیایی نتایج شناسایی مولکولی را تأیید کردند.

بحث

در این تحقیق پنج جدایه از باکتری‌های جنس باسیلوس از درختان سیب استان آذربایجان‌شرقی جداسازی و شناسایی شدند که هم علاوه بر قدرت بازدارندگی بالا علیه قارچ *Diplodia bulgarica* توان تولید فیتوهورمون اکسین (IAA) را دارا هستند. قبلاً نیز گونه‌های متعددی از جنس باسیلوس بعنوان کنترل بیولوژیک مفید گزارش شده است. در تحقیق بینده (Binanadeh, 2016) نیز از ۱۷ گونه باسیلوس برای کنترل بیمارگر مهم قارچی *Roselinia necatrix* در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد؛ که بالاترین کنترل مربوط به جدایه‌های *B. amyloliquefaciens* و *B. subtilis* به ترتیب با ۶۶/۹ و ۶۵/۹ درصد بود. مطالعات سوتو و همکاران هم نشان داده است که متابولیت‌های ثانویه که توسط باکتری *B. amyloliquifaciens* تولید می‌شود، بشدت مانع رشد مسیلیوم قارچ های *Sclerotinia sclerotiorum*، *Fusarium solani*، *R. solani* و *F. oxysporum* fsp. *lycopercici* شده‌اند (Souto *et al.*, 2004). طی این مطالعه مشخص گردید که عامل کنترل بیولوژیک از جنس باسیلوس می‌تواند جایگزینی ایده‌آل برای قارچ‌کش‌های شیمیایی برای پیشگیری و کنترل بیماری کپک‌خاکستری باشد؛ در آن تحقیق گونه ضدقارچی جدا شده از ریزوسفر گیاهان (*B. velezensis*) فعالیت ضدقارچی زیادی در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله *Botrytis cinerea*, *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *F. moniliforme*, *S. sclerotiorum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Alternaria nees*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* نشان داد.

در ایران در تحقیقات نوروزی و همکاران (Norozi *et al.*, 2024) توانایی جدایه‌های بومی باسیلوس و تولید متابولیت توسط آن‌ها به‌منظور ممانعت از رشد بیمارگرها را نشان داده شده است. در این تحقیق برخی جدایه‌های باسیلوس توان کنترل‌کنندگی در حد قارچ‌کش قوی رورال تی اس (Rovral-TS) در برابر قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* را از خود نشان دادند. در تحقیقی دیگر جهان بخش و همکاران (Jahanbakhsh *et al.*, 2014) طی مطالعه گلخانه‌ای ثابت کردند که برخی جدایه‌های باکتری‌های جنس باسیلوس در کنار کنترل بیمارگرهای مهمی مثل *Meloidogyne javanica* می‌توانند باعث بهبود رشد گیاه گوجه‌فرنگی گردند. کلاً گونه‌های مختلف *Bacillus* spp. باکتری‌های مناسبی برای تجاری‌شدن به‌عنوان ترکیبات بیوکنترلی هستند. در حال حاضر فرمولاسیون‌های مختلف و موفقی از محصولات بیولوژیک بر پایه باکتری باسیلوس در سطح جهان و ایران تولید شده که به‌عنوان قارچ کش‌ها و کودهای زیستی در سطح مزارع مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ahmadzadeh & Sharifi-Tehrani, 2021).

کنترل بیولوژیک قارچ *Diplodia bulgarica* با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست قبلا گزارش شده است (Alijani *et al.*, 2016) ولی کنترل این قارچ با استفاده از باکتری‌های اندوفیت تا کنون گزارش نشده است و این تحقیق اولین تلاش در این زمینه در ایران می‌باشد. تولید فیتوهورمون‌های گیاهی نظیر اکسین، سیتوکینین و جیبرلین توسط گونه‌های باسیلوس قبلاً گزارش شده است. اکسین از مهم‌ترین هورمون‌های گیاهی می‌باشد که به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاه شناخته می‌شود و تأثیر آن بر رشد و نمو و تمایز گیاه قابل ذکر می‌باشد (Duca *et al.*, 2014). مهم‌ترین نوع اکسین (ایندول‌استیک‌اسید) IAA است که از طریق متابولیسم ال-تریپتوفان توسط گیاهان و ریزموجودات مختلف مانند باکتری‌های اندوفیت ساخته می‌شود که به‌طور مستقیم به‌وسیله تحریک طویل شدن سلول‌های گیاه و یا تقسیم سلولی و یا به‌صورت غیرمستقیم به‌وسیله تأثیر بر فعالیت ACC دآمیناز، رشد ریشه‌های اولیه و شاخه‌ها را بیشتر نموده و تعداد ریشه‌های جانبی را افزایش می‌دهد (Geetha *et al.*, 2012). باکتری‌های وابسته به جنس *Bacillus* جزء گروه باکتری‌های بهبوددهنده رشد گیاهی محسوب می‌شوند و قادرند از طریق ترشح بعضی هورمون‌های گیاهی مانند ایندول‌استیک‌اسید (IAA)، جیبرلین و سیتوکینین، رشد گیاه را افزایش دهند. این ترکیبات باعث می‌شوند که ریشه‌های آسیب دیده توسط عوامل بیماری‌زا هر چه سریع‌تر توسط ریشه‌های جدید جایگزین شوند و به این ترتیب خسارت بیماری را کاهش دهند (Sadfi *et al.*, 2002).

کومار و همکاران (Kumar *et al.*, 2011) گزارش کردند گونه های *Bacillus* قادر به تولید ایندول‌استیک‌اسید می‌باشد که نتایج آن‌ها مشابه نتایج پژوهش حاضر می‌باشد. همچنین در مطالعه مجید و همکاران (Majeed *et al.*, 2015) مشخص شد که گونه‌های *Bacillus* به‌طور متوسط قادر به تولید ۰/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندول‌استیک‌اسید می‌باشند. سزیالگی- زچین و همکاران (Szilagyi-Zeechin *et al.*, 2014) باکتری *Bacillus* را از ریشه و ساقه گیاه ذرت جداسازی کردند و به این نتیجه دست یافتند که این باکتری قادر به تولید هورمون ایندول‌استیک‌اسید به میزان ۳/۱ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. امارسان و همکاران (Amaresan *et al.*, 2012) نیز بیان داشتند که جدایه‌های *Bacillus* قادر به تولید هورمون ایندول‌استیک‌اسید هستند که بیشترین مقدار آن۴۴ و کمترین مقدار آن ۹/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. بهبود جوانه‌زنی بذر، افزایش طول ریشه، طول شاخه و تعداد ریشه‌های جانبی گیاهچه‌های سویا به علت توانایی جدایه‌های *Bacillus* spp. در تولید ایندول‌استیک‌اسید و محلول‌سازی فسفات در آزمایشات نشان داده شده است (Wahyundi *et al.*, 2011). محققین زیادی از جمله

پارنـت و همکـاران (Parent *et al.*, 2018) احمـد و همکـاران (Ahmad *et al.*, 2018) و علـی و همکـاران (Ali *et al.*, 2009) ثابت کرده‌اند که با افزایش غلظت تریپتوفان در محـیط میـزان تولیـد IAA توسط باکتری‌ها افزایش پیدا می‌کند که این مـورد در پـژوهش حاضر نیز قابل مشاهده است.

نتیجه‌گیری

طی این بررسی ۱۱۰ جدایه اندوفیت از شاخه‌های سـالم درختـان سیب باغات استان آذربایجان شرقی جداسازی گردید. سنجش فعالیت آنتاگونیستی این جدایه‌ها در آزمایشگاه با روش کشـت متقابـل نشـان داد که ۵۰ جدایه بین ۱۰تا ۷۹ درصد توان کاهش در رشد میسـلیومی قارچ بیمارگر *Diplodia bulgarica* را دارا هسـتند. از بـین ایـن ۵۰ جدایه، پنج جدایه به‌عنوان آنتاگونیست قوی (بازدارندگی از رشد بالای ۷۰٪) با توان تولید اکسین انتخاب و شناسایی شدند. هـر پـنج جدایـه شناسایی شده در ایـن تحقیـق متعلـق بـه جـنس *Bacillus* هسـتند. بررسی سایر ویژگی‌های بیـوکنترلی و رشـدی جدایـه‌هـای انـدوفیت منتخب، توانایی آنها در کاهش شانکر شاخه سیب در شرایط گلخانه و باغ در تحقیقات تکمیلی‌تر پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از کلیـه کارکنـان آزمایشـگاه‌هـای بـاکتری شناسی و قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز کمال تشـکر را دارند.

References

1. Abdollahzadeh, J. (2015). *Diplodia bulgarica*, as a new pathogen and potential threat to the apple industry in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*, *54*, 128–132. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14686
2. Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiology Research*, *163*, 173–181. https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001
3. Ahmadzadeh, M., & Sharifi-Tehrani, A. (2021). *Plant probiotic bacteria*. University of Tehran Press, 629 pp. (In Persian)
4. Ali, B., Sabri, N., Ljung, K., & Hasnain, S. (2009). Quantification of indole-3-acetic from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*, 519-526. https://doi.org/10.1007/s11274-008-9918-9
5. Alijani, N., Manafi Shabestari, M., & Ghosta, Y. (2016). *Biocontrol effects of endophytic fungi isolated from apple trees against Diplodia bulgarica the causal agent of apple canker disease*. In 22th Iranian Plant Protection Congress (p. 339). (In Persian)
6. Alizadeh, M., Khakvar, R., & Babai-Ahari, A. (2017). Isolation and characterization of bacterial agents associated of wetwood disease on elm trees in Iran. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, *52*, 157-168. https://doi.org/10.1556/038.52.2017.028
7. Amaresan, N., Jayakumar, V., & Thajuddin, N. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chili (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem. *Indian Journal of Biotechnology*, *13*, 247-255.
8. Arzanlou, M., Mousavi, S., Bakhshi, M., Khakvar, R., & Bandehagh, A. (2016). Inhibitory effects of antagonistic bacteria inhabiting the rhizosphere of the Sugar beet plants, on *Cercospora beticola* Sacc., the causal agent of *Cercospora* leaf spot disease on Sugar beet. *Journal of Plant Protection Research*, *56*, 6-14. https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0002
9. Binandeh, N. (2016). biological control of white rot of root in some cultivars of apples and pears using antagonistic bacteria. Master thesis. Tarbiat Modarres University. 125Pp. (In Persian)
10. Bric, J.M., Bosrock, R.M., & Silversone, S.E. (1991). Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilization on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*, 535-538. https://doi.org/10.1128%2Faem.57.2.535-538.1991
11. Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., & Vasilyeva, N. (2014). Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus depends* on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *27*, 87–100. https://doi.org/10.1094/mpmi-09-13-0262-r
12. Deaker, R., László Kecskés, M., Timothy Rose, M., Amprayn, K., & Krishnen, G. (2011). Practical methods for the quality control of inoculant biofertilizers. *Australian Center for International Agriculture Research*, 104.
13. Duca, D., Lorv, J., Chery, L., Rose, D., & Bernard, R. (2014). Indol-3- acetic acid in plant- microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, *106*, 85-125. https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y
14. Eken, C. (2022). *Diplodia bulgarica*, cause of postharvest rot on apples in Turkey. *Australasian Plant Disease Notes*, *17*, 15. https://doi.org/10.1007/s13314-022-00460-4
15. Geetha, T., Vishwaprakash, N., Sycheva, M., & Babu, J.R. (2012). Sequestosome 1/p62: across diseases. *Biomarkers*, *17*, 99–103. https://doi.org/10.3109/1354750x.2011.653986

16. Gholami, M., Khakvar, R., & Aliasgarzad, N. (2013). Application of endophytic bacteria for controlling anthracnose disease (*Colletotrichum lindemuthianum*) on bean plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *46*, 1831-1838. https://doi.org/10.1080/03235408.2013.778477
17. Gholami, M., Khakvar, R., & Niknam, G. (2014). Introduction of some new endophytic bacteria from *Bacillus* and *Streptomyces* genera as successful biocontrol agents against *Sclerotium rolfsii*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *47*, 122-130. https://doi.org/10.1080/03235408.2013.805043
18. Hanifeh, S., Zafari, D., & Soleimani, M.J. (2017) Reaction of some apple cultivars to *Diplodia bulgarica* in Iran. *Mycosphere*, *8*, 1253–1260. https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/2/9
19. Jacob, J., Krishnan, G.V., Thankappan, D., & Amma, D.K.B. (2020). Endophytic bacterial strains induced systemic resistance in agriculturally important crop plants. In *Microbial Endophytes* (pp. 75-105). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819654-0.00004-1
20. Jahanbakhsh, V., Mahdikhani Moghadam, E., Baghaee Ravari, S., & Rouhani, H. (2014). Study plant growth promoting *Bacillus* isolates in tomato root colonization and *Meloidogyne javanica* population reduction. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, *28*, 79-86. https://doi.org/10.22067/jpp.v28i1.36035
21. Javadi-Dodaran, N., Khakvar, R., & Aliasgarzad, N. (2022). Isolation and characterization of bacterial endophytes from weeds against *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker of stone fruit trees. *Fundamental and Applied Agriculture*, *7*, 104-111. https://doi.org/10.5455/faa.26526
22. Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B.N. (2011). *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. Bacteria in Agrobiology. *Crop Ecosystems*, *1*, 37-59. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2
23. Luna, C.L., Mariano, R.L.R., & Souto-Maior, A.M. (2002). Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *19*, 133-140. https://doi.org/10.1590/S0104-66322002000200007
24. Majeed, A., Abbasi, M.K., Hameed, S., Imran, A., & Rahim, N. (2015). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 198. https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2015.00198
25. Mantelin, S., & Touraine, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, *55*, 27-34. https://doi.org/10.1093/jxb/erh010
26. Moslehi, S., Pourmehr, S., Shirzad, A., & Khakvar, R. (2021). Potential of some endophytic bacteria in biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *31*, 1-11. https://doi.org/10.1186/s41938-021-00396-4
27. Najari, H.H. (2020). *Guide to planting and growing apples*. Jahad Daneshgahi Press. 430 Pp. (In Persian)
28. Norozi, H., Baghaee-Ravari, S., & Mojerlou, S. (2023). Biocontrol potential of Bacillus strains in interaction with *Rhizoctonia solani* pathogen of potato. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, *54*, 187-205. https://doi.org/10.22059/ijpps.2023.357079.1007026
29. Parent, P.Z., Basime, G.C., Nachigera, G.M., Thonart, P., & Ongena, M. (2018). Efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* as biocontrol agent to fight fungal diseases of maize under tropical climates: from lab to field assays in south Kivu. *Environmental Science and Pollution Research International*, *25*(30), 29808–29821. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9314-9.
30. Sadfi, N., Cherif, M., Hajlaoui, M.R., Boudabbous, A., & Belanger, R. (2002). Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Annals of Microbiology*, *52*, 323-338.
31. Sambrook, J., Russell, D.W., & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual* (3-volume set) . New York: Cold spring harbor laboratory press, 999, 502-510.
32. Schaad, N.W., Jones, J.B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press). 373Pp.
33. Shrivastava, U.P., & Kumar, A. (2011). A simple and rapid plate assay for the screening of indole-3- acetic acid (IAA) producing microorganisms. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, *2*, 120-124.
34. Souto, G.I., Correa, O.S., Montecchia, M.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., Bachur, M., & García, A.F. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, *97*, 1247-1256. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02408.x
35. Szilagyi-Zecchin, V.J., Ikeda, A.C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C., & Galli-Terasawa, L.V. (2014). Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express*, *4*, 2-9. https://doi.org/10.1186%2Fs13568-014-0026-y
36. Thoa, N.T.K., Mai, D.T.H., Hiu, B.L., Duong, C.A., Chau, N.N.B., Nghiep, N.M., & Quoc, N.B. (2022). Roles of β-Indole acetic acid (IAA) producing endophytic bacteria on the recovery of plant growth and survival ability of sugarcane infected white leaf disease (SWLD). *Current Microbiology*, *79*, 389. https://doi.org/10.1007/s00284-022-03091-1

37. Vasebi, Y., Khakvar, R., & Vinatzer, B.A. (2023). Characterization of culturable epiphytic and endophytic bacteria of *Prunus* spp. and their potential for plant growth promotion and antagonistic activity against bacterial canker disease. *Journal of Plant Pathology*, *105*(3), 749-766. https://doi.org/10.1007/s42161-023-01342-z
38. Wahyudi, A.T., Astuti, R.P., Widyawati, A., Meryandini, A., & Nawangsih, AA. (2011). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials, 3*, 34-40.
39. Zeynali Bari, R., Abrinbana, M., & Ghosta, Y. (2021). Genetic variation, vegetative compatibility, and aggressiveness diversity of *Diplodia bulgarica* isolates from apple orchards in West Azarbaijan province of Iran. *Plant Pathology*, *70*, 1326-1341. https://doi.org/10.1111/ppa.13374